

XVI INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS
REPRINT

XVI^{ÈME} CONGRES INTERNATIONAL DE LAITERIE
TIRAGE A PART

XVI INTERNATIONALER MILCHWIRTSCHAFTSKONGRESS
SONDERDRUCK

XVI INTERNATIONALE MEJERIKONGRES
SÆRTRYK



KØBENHAVN 1962

Examen par chromatographie, électrophorèse et immuno-électrophorèse de diverses préparations de caséine*

J. GARNIER, B. RIBADEAU DUMAS & J. GAUTREAU

avec la collaboration technique de G. BRIGNON et M. VEAUX,
Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières,
JOUY-en-JOSAS (Seine-et-Oise), France

Le fractionnement de la caséine est un problème actuellement en évolution et il nous a paru intéressant de comparer de nouvelles préparations de caséine avec celles, plus classiques, connues sous les noms de caséines α et β . Pour cette comparaison nous avons employé deux procédés de séparation : la chromatographie sur DEAE cellulose et l'électrophorèse en gélose. Ces deux procédés séparent les différents composants de la caséine selon leur charge électrique, aussi donnent-ils des résultats comparables. Les composants ayant migré en gélose ont été révélés soit par coloration, soit par précipitation spécifique avec un immunsérum anti-caséine entière de lait de vache. Sauf en ce qui concerne les immuno-électrophorèses, nous avons effectué ces séparations en milieu urée dont le pouvoir dispersant a été récemment mis à profit (1, 2, 3, 4) et à qui l'on attribue (5) un rôle dans la séparation des différents constituants de la caséine associés en complexes.

TECHNIQUES

1) Préparation des différentes caséines

La caséine entière a été préparée par précipitation à pH 4,7 du lait de vache écrémé, suivie de 4 lavages puis redissolution à pH 7. Ces opérations ont été répétées quatre fois. La caséine n'a pas été traitée par l'alcool et l'éther mais la solution a été lyophilisée à pH 7. Pour éliminer les traces de graisse la solution concentrée (10%) de caséine à pH 7 a été centrifugée pendant 60 mn à 53.000 g.

- la caséine β préparée par la méthode à l'urée (6) nous a été fournie par le Dr McMeekin**.
- la caséine α , préparée également par la méthode à l'urée (6) nous a été fournie par C. Alais**.
- la caséine α_s a été préparée à partir de la caséine entière selon la méthode de Waugh et al. (7) par précipitations répétées par le calcium, à basse température.

* Ce travail a bénéficié en partie d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis (FG - Fr - 10.3-61).

** Nous sommes heureux de le remercier encore ici bien vivement.

- la caséine α_2 a été préparée selon la méthode de McMeekin et al. (8).
- nous avons étudié deux préparations de caséine κ , l'une obtenue par centrifugation selon Waugh et al. (9) l'autre préparée selon la technique de Muzie et Wake (10).

2) Chromatographie sur colonne

Les différentes préparations de caséine ont été chromatographiées sur I cellulose (Eastman ou Serva) en milieu urée selon Waugh et al. (3) en éluant un gradient de NaCl (4).

La chromatographie a été effectuée à température ordinaire sur des colonnes de 1 cm de diamètre et 10 cm de longueur. La protéine est fixée sur la colonne dans un tampon I imidazole 0,01 M - HCl, de pH 7, en urée 4,5 M et élué avec un tampon II imidazole 0,02 M - HCl, de pH 7, en urée 3,3 M par un gradient exponentiel de force ionique (NaCl - 0 à 0,6 M). L'éluat est recueilli par fractions de 1,5 ml à raison d'une fraction toutes les 6 min. La concentration en protéine des fractions est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 m μ dans des cuvettes de 10 mm d'épaisseur.

3) Electrophorèse en gélose

La technique de Grabar et Williams (11) a été employée. Nous nous sommes inspirés de Wake et Baldwin (2) dans l'emploi de l'urée 5 M et du tampon phosphate à pH 6,5. Les électrophorèses ont été effectuées en chambre froide sur des plaques de verre de 105 mm \times 45 mm, recouvertes d'une épaisseur de 0,1 mm de gélose Difco lavée, à 1%, en tampon phosphate de force ionique 0,05. Une tension de 5 volts/cm est appliquée à la plaque pendant 2 heures. Les plaques sont colorées au noir amido 10 B (Merk) et séchées. Comme l'urée abaisse la température de solidification de la gélose il est nécessaire, avec cette technique, de conduire toutes les opérations en chambre froide.

4) Immuno-électrophorèse

41 - Technique d'immunisation

La caséine entière de lait de vache a été mélangée à l'adjuvant d'immunisation Freund et McDermott selon la méthode de Kabat et al. (12). Pour cela la caséine est dissoute dans 60 ml d'eau physiologique (9,5 g NaCl/litre) avec 1% de phénol. Cette solution est mélangée dans un mortier avec environ 100 mg d'aquaphor* porté à 40°C. On ajoute alors 100 ml d'huile de paraffine et 300 mg de bacilles tuberculeux tués par la chaleur. On mélange soigneusement avec le pilon en maintenant le mortier dans un bain-marie à 40°C. Puis l'émulsion antigénique est répartie par fractions de 25 ml dans des flacons stériles à visser et conservée à la glacière. Pour la vaccination le flacon est réchauffé pour liquéfier l'émulsion et l'injection est faite avec une seringue (aiguille

* Duke Laboratory, Sth. Norwalk, Conn. U.S.A.

14/10 mm, L = 40 mm). Dix-huit lapins ont été immunisés à raison d'une injection de 1 ml du mélange antigénique par semaine pendant 14 semaines. L'injection est faite sous la peau du dos de l'animal. Le sang est prélevé une dizaine de jours après la dernière piqûre soit par ponction intracardiaque, soit en sacrifiant l'animal. Le sang est recueilli avec un soin particulier, de façon à éviter l'hémolyse. Pour cela, il est versé dans des flacons propres, lavés au mélange sulfochromique, et stériles. Ces flacons sont placés sur une paillasse en position inclinée sous un angle de 30° en évitant de les remuer. Une fois le coagulum formé, on attend quelques heures la rétraction du caillot et l'on prélève le sérum surnageant qui est éventuellement centrifugé pour éliminer les quelques hématies restantes. Toutes ces opérations sont faites en respectant les conditions de manipulation aseptiques. Le sérum est additionné de merthiolate (0,1 %) et congelé.

Le sérum des lapins ayant un titre trop faible en anticorps est concentré, soit par dialyse contre une solution à 40 % de Subtosan (Polyvinylpyrrolidone), soit par précipitation des globulines dans les conditions suivantes : à deux volumes de sérum on ajoute un volume de $\text{SO} \cdot (\text{NH}_4)_2$ saturé, on centrifuge 15 mn à 2.500 t/minute, le précipité est repris dans 1/2 volume d'eau distillée et dialysé contre une solution d'eau physiologique ; il est quelquefois nécessaire de centrifuger après dialyse pendant 10 mn à 4.500 t/minute, on ajoute du merthiolate à raison de 0,1 %.

42 – Immuno-électrophorèse

Nous avons employé une semi-microméthode adaptée de la technique de Grabar et Williams (11). La technique d'électrophorèse est identique à celle décrite pour l'électrophorèse en gélose, sauf pour les points suivants :

- dimension du réservoir de sérum 70 mm × 2 mm.
- distance du réservoir d'antigène au réservoir du sérum 4 à 6 mm, selon les sérums.
- tampon véronal pH = 8,2 μ = 0,025 dans la gélose et 0,05 dans les bacs à électrodes.

Les lignes de précipitation apparaissent le lendemain ou dans les jours qui suivent. Elles sont souvent difficiles à photographier et deviennent mieux visibles après coloration à l'azocarmin ou au Rouge ponceau (13).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les électrophorèses et immuno-électrophorèses ont été groupées respectivement dans les figures 1 et 2 et les chromatographies dans les figures 3 à 8.

L'analyse des résultats concernant la caséine entière a déjà été faite par l'un d'entre nous (4) et sera développée dans une publication ultérieure. Néanmoins nous présentons ces résultats dans les fig. 1, 2 et 3 comme élément de référence.

L'électrophorèse en gélose de la caséine β ne décèle qu'un composant ; cependant l'immuno-électrophorèse permet de distinguer en plus de la ligne principale

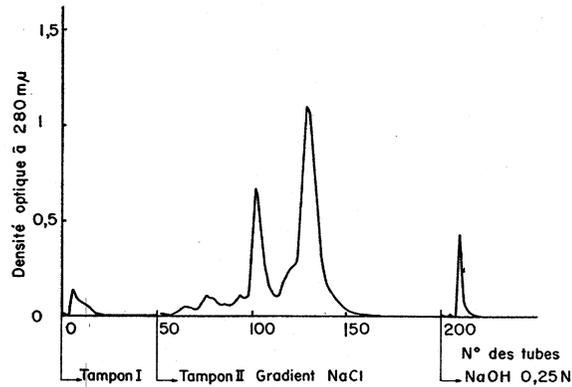


Figure 3. Chromatographie sur DEAE cellulose en milieu urée de la caséine entière.

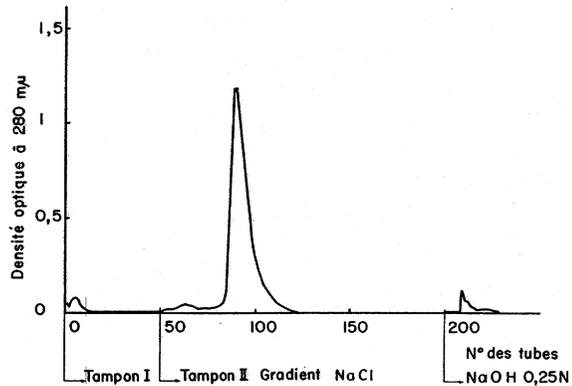


Figure 4. Chromatographie sur DEAE cellulose en milieu urée de la caséine β .

de précipitation, deux fines lignes correspondant vraisemblablement à des impuretés en faible concentration (5%) comme le montre l'analyse chromatographique (fig. 4). Les pourcentages sont établis d'après la mesure des densités optiques, mais cela ne donne qu'une idée approximative de la proportion de chacun des constituants. En effet le coefficient d'extinction peut varier beaucoup d'un constituant à l'autre ; par exemple celui de la caséine β est la moitié de celui de la caséine α et sauf cette exception il n'est pas connu. Enfin nous n'avons pas tenu compte en général du matériel élué dans la soude, car sa signification est mal définie (4).

Les électrophorèses de caséine α indiquent l'existence de trois bandes principales, dont deux se trouvent dans α_s et la troisième correspond sans doute aux caséines κ et β non séparés par cette technique. L'examen comparé des immuno-électrophorèses et de la chromatographie montre qu'il reste encore 6 à 7% de caséine β (fig. 2 et 5), ceci calculé en tenant compte du coefficient d'extinction de la caséine β . Les composants élués dans le tampon I et au début du gradient NaCl sont également en plus faible proportion que dans la caséine entière.

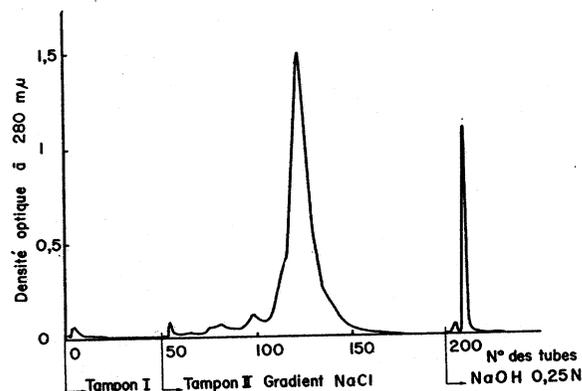


Figure 5. Chromatographie sur DEAE cellulose en milieu urée de la caséine α_1 .

La caséine α_s présente deux constituants par électrophorèse en gélose. Celui contenu en plus faible proportion est visible par chromatographie où il forme une épaulement à gauche du pic principal. Il représente environ 15% de la caséine α_s (fig. 6). Le pic principal représente environ 80% de la caséine α_s et compte tenu de deux petites lignes centrales souvent confondues qui peuvent être attribuées à la caséine κ , l'immuno-électrophorèse laisse supposer l'existence de deux autres composants dont l'un est en proportion assez importante puisqu'après quelques jours de diffusion cette ligne disparaît par excès d'antigène. Ils correspondraient aux caséines α_{s2} et α_{s1} , récemment signalées par Waugh et al. (14).

La préparation de caséine α_2 que nous avons faite est remarquable surtout par l'importance du matériel (20-30%) qui n'est pas retenu par la colonne de DEAE cellulose et migre en arrière du réservoir d'électrophorèse. Il est possible que cette caséine contienne comme contaminant la caséine κ , à cause de sa sensibilité à

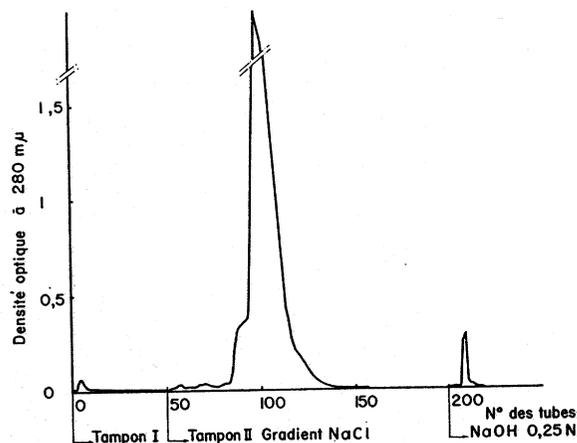


Figure 6. Chromatographie sur DEAE cellulose en milieu urée de la caséine α_s .

présure (8 et 15), mais l'analyse immuno-électrophorétique ne permet pas de le confirmer, les lignes de précipitation au nombre de trois étant peu visibles (fig. 2).

L'examen électrophorétique de la caséine κ (selon McKenzie et Wake) révèle une bande très fortement colorée migrant à la hauteur de β et deux autres bandes plus difficiles à mettre en évidence, dont l'une migre à la hauteur de la bande principale de la caséine α_s . Il faut noter qu'en absence d'urée une électrophorèse faite dans les mêmes conditions ne révèle qu'une bande, mais à la hauteur de la caséine α . La mobilité de la caséine κ est donc fortement modifiée par la présence d'urée, ce qui ne se produit pas avec les caséines α ou β . De plus la bande principale est

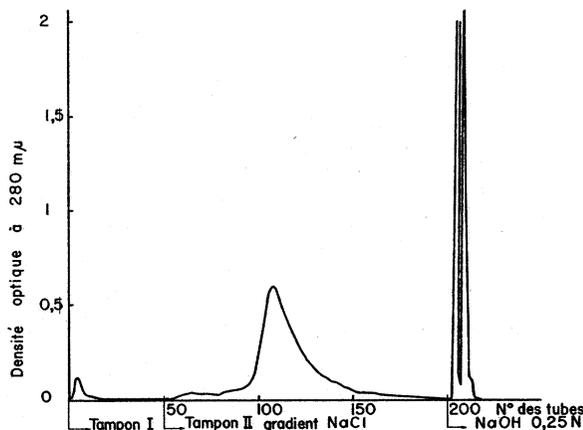


Figure 7. Chromatographie sur DEAE cellulose en milieu urée de la caséine κ (McKenzie, Wake).

striée, marquant une forte interaction avec la gélose, comme d'ailleurs avec la DEAE cellulose puisqu'environ 40% de la caséine κ ne peuvent être élués (en deux pics) que par la soude 0,25 N (fig. 7). Environ 2 à 3% de la caséine κ ne sont pas retenus par la colonne. Par immuno-électrophorèse, quatre lignes de précipitation sont visibles et une cinquième peut être décelée après coloration. Deux de ces lignes sont parallèles et assez peu distinctes, cependant elles apparaissent en même temps et nous pensons qu'elles peuvent correspondre à deux composés antigéniques de même mobilité. Par surcharge de la caséine α_s en caséine κ il nous semble possible d'identifier ces deux lignes avec la petite ligne centrale, souvent résolue en deux lignes, observée dans la caséine α_s qui contiendrait ainsi un peu de caséine κ comme impureté (fig. 2).

La préparation de caséine κ selon Waugh (9) (fig. 8) montre une assez forte contamination en caséine α_s (approximativement 10%) et en produits mineurs peu retenus par la colonne. Elle montre, comme la caséine κ , préparée selon McKenzie et Wake, une partie importante de matériel élué par la soude mais en proportion moindre (20%).

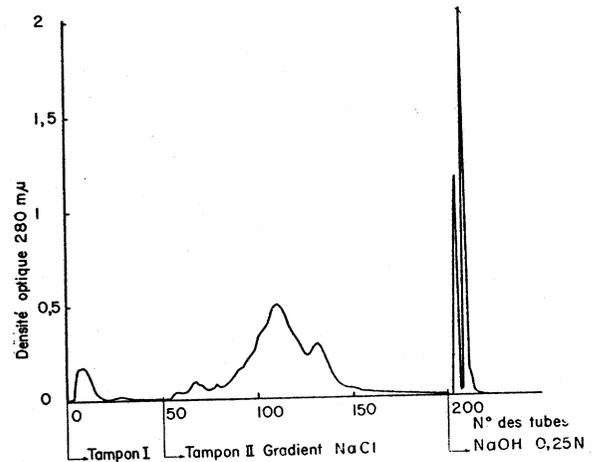


Figure 8. Chromatographie sur DEAE cellulose en milieu urée de la caséine κ (Waugh).

En conclusion la caséine β semble être l'une des meilleures préparations, avec un composant principal qui représente environ 95% de la préparation. La caséine α_s est plus complexe et nous pouvons, en première approximation, la considérer comme composée de 65% de caséine α_{s2} , de 15% de caséine α_{s1} (14), de 15% d'un composant non identifié différent de la caséine κ et de 5% de composants en faible proportion comme la caséine β , κ , etc. . . . La caséine κ se remarque par son interaction particulière avec la gélose et la DEAE cellulose. Elle n'est pas immunologiquement pure, mais les différentes lignes de précipitations observées ne suffisent pas à préciser la proportion des différents constituants car un composant très antigénique peut donner une ligne de précipitation bien définie, même s'il est en faible proportion.

REFERENCES

- (1) Payens T. A. J. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **46** 441.
- (2) Wake R. G., Baldwin R. L. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **47** 225.
- (3) Waugh D. F., Garnier J., Gillespie J. M. et Brown C. (en cours de publication).
- (4) Ribadeau Dumas B. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **54** 400.
- (5) Burk N. F., Greenberg D. M. (1930) *J. Biol. Chem.* **87** 197.
- (6) Hipp N. J., Groves M. L., Custer J. H. et McMeekin T. L. (1952) *J. Dairy Sci.* **35** 272.
- (7) Waugh D. F., Ludwig M., Gillespie J. M., Garnier J., Kleiner E. S., Noble R. (1960) *Fed. Proceedings*, 19, n° 1, Part 1, 337.
- (8) McMeekin T. L., Groves M. L. et Hipp N. J. (1957) *131st Meeting of the Am. Chem. Soc.* p. 65c
- (9) Waugh D. F. (1958) *Far. Soc. Disc.* **25** 186.
- (10) McKenzie H. A., Wake R. G. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **47** 240.
- (11) Grabar P., Williams C. A. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* **17** 67.
- (12) Kabat E. A., Mayer M. M. (1948) *Experimental Immunochimistry*, p. 544.
- (13) Grabar P., Burtin P. (1960) *Analyse Immuno-Electrophorétique*, p. 38.
- (14) Waugh D. F., Ludwig M., Dreizen P., Noble R. (1961) *Cong. Int. de Biophys.*
- (15) Garnier J. (1959) *XV Cong. Int. Laiterie*, Londres (1959) **3** 1448. Stockholm, 196.

*Examen par chromatographie, électrophorèse et immuno-électrophorèse
de diverses préparations de caséine*

J. Garnier, B. Ribadeau Dumas & J. Gautreau,
Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières,
JOUY-en-JOSAS (Seine-et-Oise), France

RESUME

Les caséines α , α_s , α_2 , κ et β ont été examinées par chromatographie sur DEAE cellulose, par électrophorèse en gélose et par immuno-électrophorèse. Aucune de ces préparations ne se montre homogène avec les trois techniques. L'importance de chaque constituant dans chacune des préparations a été évaluée.

*Chromatographic, Electrophoretic and Immuno-electrophoretic Analyses
of Different Casein Preparations*

J. Garnier, B. Ribadeau Dumas & J. Gautreau,
Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières,
JOUY-en-JOSAS (Seine-et-Oise), France

SUMMARY

The fractions α -, α_s -, α_2 -, κ - and β -caseins have been examined by DEAE cellulose chromatography, agar gel electrophoresis and immunoelectrophoretic analysis. None of these preparations has been found homogeneous with three methods. The amount of the components present in each preparation has been estimated.

*Chromatographische, elektrophoretische und immunoelektrophoretische
Untersuchung verschiedener Kaseinpräparate*

J. Garnier, B. Ribadeau Dumas & J. Gautreau,
Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières,
JOUY-en-JOSAS (Seine-et-Oise), France

ZUSAMMENFASSUNG

α -, α_s -, α_2 -, κ - und β -Kasein wurden mit Hilfe der Chromatographie auf DEAE-Cellulose, der Agar-Agar-Elektrophorese und der Immunelektrophorese untersucht. Keines dieser Präparate erwies sich bei den drei Verfahren als homogen. Die Bedeutung der Einzelbestandteile jedes der untersuchten Präparate wurde ermittelt.